

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

CAMILA DE OLIVEIRA LIMA AMORIM

**USO DE IMUNOTERAPIA EM CÃES COM OSTEOSSARCOMA APENDICULAR NÃO
AMPUTADO ASSOCIADO À QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA E
BISFOSFONATOS**

JABOTICABAL - SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

USO DE IMUNOTERAPIA EM CÃES COM OSTEOSSARCOMA APENDICULAR NÃO
AMPUTADO ASSOCIADO À QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA E
BISFOSFONATOS

Camila de Oliveira Lima Amorim

Orientador: Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” - Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para
graduação em Medicina Veterinária.

JABOTICABAL - SP

2023

A524u Amorim, Camila de Oliveira Lima
Uso de imunoterapia em cães com osteossarcoma apendicular não amputado associado à quimioterapia antineoplásica e bisfosfonatos / Camila de Oliveira Lima Amorim. -- Jaboticabal, 2024
44 f. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Andriago Barboza De Nardi

1. Imunoterapia. 2. Osteossarcoma. 3. Bisfosfonatos. 4. Cães. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE JABOTICABAL

DEPARTAMENTO: Clínica e Cirurgia Veterinária

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO: USO DE IMUNOTERAPIA EM CÃES COM OSTEOSSARCOMA APENDICULAR
NÃO AMPUTADO ASSOCIADO À QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA E
BISFOSFONATOS

ACADÊMICO: Camila de Oliveira Lima Amorim

CURSO: Medicina Veterinária

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi

Aprovado e corrigido de acordo com as sugestões da Banca Examinadora

BANCA EXAMINADORA:

	(Nomes)
Presidente	Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi
Membro	MSc. Noelia Carolina Talavera Guillén
Membro	MSc. Gabriel João Unger Carra

(Assinaturas)

Jaboticabal 20 / 12 / 23

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 20 / 12 / 23

Chefe do Departamento

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer e dedicar este trabalho aos meus familiares, Mary, Romildo, Inácio, Caroline, Matheus e Sthefany por todo apoio e suporte ao longo desta minha trajetória, este sonho apenas foi possível graças a vocês.

Agradeço às minhas companheiras de graduação, Suzana, Cássia, Giovanna e Fabiana por todos os momentos juntas, todo esse processo certamente foi mais divertido com vocês ao meu lado.

Agradeço ao meu orientador, Prof Dr. Andriago De Nardi pela oportunidade de desenvolver este estudo e por todo conhecimento compartilhado.

Deixo ainda meu muito obrigado a todos os pós-graduandos do Setor de Oncologia Veterinária, estar com vocês foi enriquecedor e me fez crescer não apenas profissionalmente mas como pessoa também.

À doutoranda Noelia Talavera, gostaria de agradecer por todos os ensinamentos, toda ajuda e suporte prestado desde o nosso primeiro contato. Por ser paciente e estar sempre disposta a ensinar e sanar toda e qualquer eventual dúvida por mim apresentada, por acreditar em mim e em meu potencial, mesmo quando nem eu mesma o fazia. Obrigada por toda a experiência e risadas compartilhadas, é muito bom saber que nossos pacientes podem contar com alguém como você.

Agradeço ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), processo nº 4/2022 e a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Gostaria ainda de dedicar este trabalho ao Loghan, cachorro da família, por nos ensinar o que é amar e ser amado todos os dias. À Antônia por me fazer mais forte e à Michele por ter sido companheira em momentos tão difíceis.

Em especial, dedico este trabalho para nossa Dona Bela. Obrigada por ter cuidado tão bem de nós durante todos os anos em que aqui esteve presente. Este trabalho e toda a minha trajetória na medicina veterinária serão sempre dedicados à senhora.

RESUMO

O osteossarcoma (OSA) é a neoplasia óssea maligna de maior prevalência em cães de raças grandes, atingindo principalmente o esqueleto apendicular. Sendo caracterizado como um tumor imunogênico, a interação RANK/RANKL e células do sistema imune participam do desenvolvimento tumoral e contribuem para que este exerça um comportamento biológico localmente agressivo e altamente metastático. A progressão da doença é a principal responsável pelo óbito do paciente.

O tratamento de eleição é a amputação do membro acometido associada à quimioterapia antineoplásica adjuvante. Entretanto, cães com comorbidades musculoesqueléticas e/ou neurológicas concomitantes podem inviabilizar a ressecção cirúrgica do membro acometido, impedindo a remoção do tumor primário e dificultando o controle de dor nesses pacientes.

Frente a essa questão, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a resposta terapêutica do emprego de imunoterapia associada à quimioterapia antineoplásica e bisfosfonatos em cães com OSA apendicular inoperável.

Os resultados demonstraram que esta associação promoveu maior sobrevida, maior tempo livre de metástase e controle de dor mais efetivo. Em conclusão, em virtude do mecanismo de progressão tumoral do osteossarcoma, a associação de imunoterapia, quimioterapia e bisfosfonatos pode ser considerada como uma nova alternativa terapêutica para cães com OSA não amputados, proporcionando maior qualidade de vida ao paciente.

Palavras chave: osteossarcoma, imunoterapia, bisfosfonatos, cães

ABSTRACT

Osteosarcoma (OSA) is the most prevalent malignant bone neoplasm in large breed dogs, mainly affecting the appendicular skeleton. Characterized as an immunogenic tumor, the RANK/RANKL interaction and immune system cells participate in tumor development and contribute to its locally aggressive and highly metastatic biological behavior. The progression of the disease is primarily responsible for the patient's death.

The treatment of choice is amputation of the affected limb associated with adjuvant antineoplastic chemotherapy. However, dogs with concomitant musculoskeletal and/or neurological comorbidities can make surgical resection of the affected limb unfeasible, preventing removal of the primary tumor and hindering pain control in these patients.

In view of this issue, the aim of this study was to evaluate the therapeutic response to the use of immunotherapy associated with antineoplastic chemotherapy and bisphosphonates in dogs with inoperable appendicular OSA.

The results showed that this association promoted longer survival, greater metastasis-free time and more effective pain control. In conclusion, given the mechanism of tumor progression in osteosarcoma, the combination of immunotherapy, chemotherapy and bisphosphonates can be considered a new therapeutic alternative for dogs with non-amputable OSA, providing a better quality of life for the patient.

Key words: osteosarcoma, immunotherapy, bisphosphonates, dogs

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Osteossarcoma apendicular canino: áreas de maior ocorrência. Created with BioRender.com.....	15
Figura 2 - Radiografia de membro torácico direito.....	17
Figura 3 - Radiografia de membro pélvico esquerdo.....	17
Figura 4 - Radiografia de pulmão com presença de nódulos metastático.....	18
Figura 5 - Can. Rottweiler - Aumento de volume em membro torácico direito (A); Can. Golden Retriever - Aumento de volume em membro pélvico esquerdo (B).....	25
Figura 6 - Massa em membro torácico direito. (A, B) Ao corte, massa encapsulada de coloração acastanhada em região de rádio.....	26
Figura 7 - Presença de nódulos em pulmão (A e B). Ao corte, nódulos calcificados (C).....	27
Gráfico 1 - Análise de sobrevida pelo Método Kaplan-Meier dos pacientes com OSA apendicular não amputados frente ao Tratamento Experimental (Grupo A).e Tratamento Controle (Grupo B).....	28
Gráfico 2 - Análise de tempo livre de metástase frente ao Tratamento Experimental (Grupo A) e Tratamento Controle (Grupo B).-.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cães incluídos na pesquisa: raça, sexo e idade.....	24
Tabela 2 - Cães incluídos na pesquisa: raça, tipo histológico e sobrevida.....	24
Tabela 3 - Sinais adversos frente tratamento com Oncotherad®: Frequência e intensidade.....	30

LISTA DE SIGLAS

AINES	Anti inflamatórios não esteroidais
BF	Bisfosfonatos
IFN	Interferones
IV	Intravenosa
NK	Natural killers
OPG	Osteoprotegerina
OSA	Osteossarcoma
PG's	Prostaglandinas
TLR's	Toll like receptors
Tregs	Células T regulatórias
VO	Via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	OBJETIVO.....	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
	3.1 Osteossarcoma em cães.....	13
	3.2 Controle de dor e preservação do membro.....	17
	3.3 Quimioterapia.....	18
	3.4 Imunoterapia.....	18
	3.5 Bisfosfonatos.....	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
	4.1 Seleção de casos.....	21
	4.2 Tratamento.....	21
	4.3 Análise estatística.....	22
5	RESULTADOS.....	23
	5.1 Dados epidemiológicos.....	23
	5.2 Achados patológicos.....	24
	5.3 Tempo de sobrevida e Tempo livre de metástase.....	26
6	DISCUSSÃO.....	30
	CONCLUSÃO.....	34
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

O osteossarcoma (OSA) é o tumor ósseo maligno de maior ocorrência em cães, correspondendo a 85% das neoplasias ósseas primárias. Os cães de grande porte são os mais acometidos, com maior ocorrência de desenvolvimento da afecção no esqueleto apendicular, atingindo principalmente a região metafisária dos ossos longos, seguido da região cortical e periósteo (Misdorp & Hart, 1979; Spodnick et al, 1992; Ogilvie, 2001). As raças mais acometidas incluem Rottweiler, Labrador e Golden Retriever (Tuohy, J. L. et al., 2019).

O comportamento natural do OSA é altamente metastático, sendo os pulmões os primeiros órgãos a apresentarem metástase, porém, pode comprometer outros órgãos. O diagnóstico é obtido por meio da avaliação histopatológica obtida pela biópsia óssea incisional e o tratamento de eleição é amputação do membro acometido associado à quimioterapia antineoplásica adjuvante ou radioterapia como ferramenta estratégica para aumentar sobrevida e tempo livre de metástase. No entanto, essa abordagem cirúrgica sofre contraindicação em pacientes com comorbidades que interferem na locomoção. Nestes, há a necessidade da implementação de abordagens terapêuticas alternativas, as quais visam o retardo da progressão da doença e, sobretudo, a analgesia adequada. O manejo da dor nesses pacientes é desafiador, pois, há ocorrência de microfraturas ou interrupção do periósteo devido a processo de osteólise do osso provocado pelo desenvolvimento tumoral (Daleck C. R et al, 2002), ainda, níveis elevados de prostaglandinas (PGs) atuam promovendo inflamação, vasodilatação e dor (Yamamura, S. et al., 1997), e as IL-6 atuam mediando as interações tumor-hospedeiro e facilitando a colonização de células de osteossarcoma no pulmão (Gross, A. C. et al., 2018).

Frente ao comportamento metastático agressivo do OSA, a administração de quimioterapia torna-se uma medida necessária na busca de maior tempo de doença estável e alívio dos sinais clínicos associados (Daleck et al., 2002). Dentre os fármacos disponíveis no mercado, a Carboplatina tem demonstrado maior eficácia, podendo ser utilizada em protocolo individual ou em associação com a doxorubicina (Lascelles, B. D. X et al. 2005; Bergman, PJ et al., 1996) tornando-se a droga de eleição nestes casos, promovendo aumento da taxa de sobrevida (Phillips, B. et al., 2009).

Sabe-se ainda que a manutenção do tecido ósseo se dá por meio do equilíbrio entre os processos de formação e reabsorção óssea. Contudo, doenças como osteoporose, hipercalcemia e a ocorrência de

tumores acabam por comprometer esse mecanismo levando a prejuízos ao tecido ósseo, onde o aumento da reabsorção óssea por parte dos osteoclastos promove dor intensa, aumento do risco de fraturas e atuam no direcionamento das células tumorais. O ativador do receptor do ligante NF- κ B (RANKL), expresso por células do tecido ósseo e células do sistema imune, seu receptor RANK e a osteoprotegerina (OPG) estão envolvidos na regulação da ativação, diferenciação e sobrevivência dos osteoclastos, que desempenham papéis críticos na formação de metástases ósseas, de modo que, a supressão do sistema RANK/RANKL/OPG e da atividade dos osteoclastos pode atuar na queda das taxas de reabsorção óssea e prevenir metástases ósseas (Zhang, Y. et al., 2022).

Na oncologia veterinária, o uso de bisfosfonatos (BFs) têm se mostrado eficaz no tratamento de pacientes acometidos por OSA, sua ação consiste em fazer ligação com cristais de hidroxiapatita de modo a evitar a dissolução do cálcio em fósforo e promover morte celular programada dos osteoclastos (Russel RG et al, 2007), de modo que essa apoptose mediada pelo uso dos BFs promove mudanças morfológicas características, com perda de potencial de membrana da mitocôndria, com ativação de caspases, atuando assim na inibição da reabsorção óssea e no controle da dor, sendo uma possibilidade para cães com preservação do membro (Jark PC et al, 2013), pois inibe a via RANK/RANK-L/OPG, a qual é importante na atividade osteoclástica-osteocítica e na progressão tumoral (Ming J et al, 2020). Assim, acredita-se que a inibição desta via de sinalização possa influenciar no aumento da sobrevida do paciente (Canon J. R. et al, 2007). Um estudo realizado por Ory, B. (2005), demonstrou o efeito supressor de metástases pulmonares e o aumento da sobrevida em camundongos portadores de osteossarcoma submetidos a tratamento com ácido zoledrônico, e na medicina humana, o estudo conduzido por Conry, R. M. (2016) mostrou que o uso do ácido zoledrônico aumentou o tempo de doença estável em quatro pacientes com osteossarcoma metastático. Em humanos, Meyers, P. A. (2011) concluiu que há segurança na associação de pamidronato e quimioterapia para tratamento de osteossarcoma e, estudo realizado por Liu, J. (2019) demonstrou que essa associação terapêutica pode promover maior analgesia e efeito curativo, controlando os efeitos colaterais adversos decorrentes de câncer ósseo metastático em idosos.

Também, sabe-se que o OSA é um câncer imunogênico, onde as células tumorais liberam fatores solúveis pró oncogênicos (IL-6, IL-11, TNF- α , RANKL, entre outros.) e levam ao processo de diferenciação e maturação dos osteoclastos por meio dos osteoclastos com alteração de funções, dando origem a um ciclo vicioso. Assim, de forma desregulada, os osteoblastos e as células

precursoras de osteoclastos expressam RANKL, potencializam a formação de osteoclastos, induzindo reabsorção óssea. Esse processo de degradação do tecido ósseo leva a liberação de fator de crescimento transformador- β (TGF- β) que estimulam a formação de tecido ósseo e proliferação tumoral. Por esta razão, estudos sugerem o emprego de imunoterapia como uma possível nova ferramenta terapêutica para o estímulo do sistema imune do paciente para, assim, controlar a progressão do tumor (C. Chen et al, 2021; Lamora, A. et al., 2016; Wang J et al, 2019). Frente a isso, a submissão do paciente ao protocolo multimodal com quimioterapia antineoplásica, bisfosfonatos e imunoterapia pode ser uma alternativa viável aos pacientes cuja remoção cirúrgica do membro não pode ser realizada.

No Brasil, o Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia (Instituto de Biologia – UNICAMP), liderado pelo professor Dr. Wagner José Favaro em parceria com o NANOBIOSS (Instituto de Química- UNICAMP), supervisionado pelo Prof. Nelson Duran, desenvolveu um composto sintético com propriedades antitumorais e imunológicas denominado MRB-CF-1 (Modificador de Resposta Biológica – Complexo Fosfato Inorgânico 1), registrado como Oncotherad®.

O Oncotherad®, é um agonista dos receptores Toll-like (TLR) 2 e 4 que induz a ativação dos interferones (IFN) e STING e, conseqüentemente, aumenta a produção do IFN-alfa e IFN-gamma. Essa ativação permite produzir linfócitos T citotóxicos (CD8+), células dendríticas, Natural Killers (NK) e macrófagos tipo 1, o que induz a morte das células neoplásicas. Em adição, diminui a expressão do sistema RANK/RANKL, o que resulta na prevenção e/ou controle das metástases (Alonso et al., 2020; Böckelmann et al., 2019; Durán et al., 2019; Fávaro et al., 2019).

Diante do exposto, a proposta de emprego de quimioterapia antineoplásica associada a imunoterapia (MRB-CFI) e bisfosfonatos em cães com osteossarcoma apendicular não amputados é baseada na necessidade de um tratamento mais eficaz do que o que é utilizado atualmente, feito apenas com uso de quimioterapia e analgésicos.

2 OBJETIVO

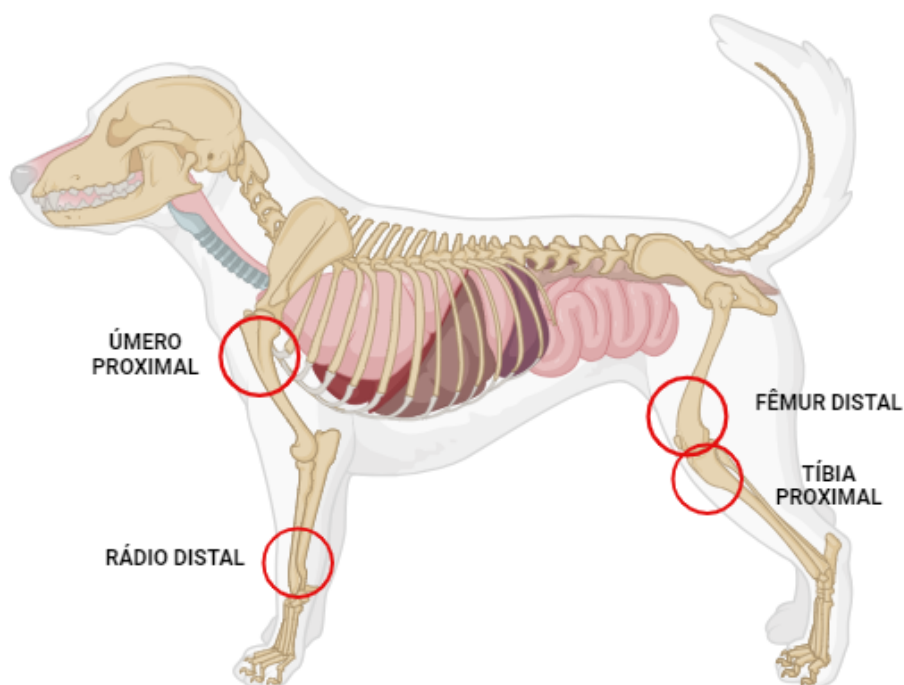
Analisar resposta terapêutica nos pacientes com OSA apendicular inoperável tratados com imunoterapia, quimioterapia antineoplásica e bisfosfonatos, com o intuito de evidenciar os efeitos advindos dessa associação na modulação do sistema imune, tratamento oncológico e sua efetividade no controle da dor em pacientes que não podem ser submetidos à amputação do membro.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Osteossarcoma em cães

O osteossarcoma é um tumor ósseo primário de origem mesenquimal maligna, sendo responsável por 85% dos tumores esqueléticos em cães, atingindo principalmente o esqueleto apendicular (Wycislo, K. L. et al., 2015; Straw, 1996). É caracterizado como um tumor de exacerbada agressividade local e grande potencial metastático tendo os pulmões como principal sítio de metástase (Daleck C. R et al, 2002). A Figura 1 apresenta as áreas de maior ocorrência do tumor nos cães.

Figura 1 - Osteossarcoma apendicular canino: áreas de maior ocorrência. Created with BioRender.com



Created in BioRender.com 

A etiologia do osteossarcoma ainda não é totalmente conhecida. Na literatura, há evidências de que a ocorrência de trauma microscópico pode vir a ser um fator predisponente para ocorrência de OSA

(Daleck et al., 2016). Também, a presença de alterações genéticas é considerada como um possível fator de desenvolvimento tumoral. De acordo com Ehrhart et al. (2013), o gene supressor p53 apresenta modificações e é expressado em excesso, sendo mais frequente em ossos apendiculares, indicando sua ação como um fator de maior agressividade no OSA canino.

Histologicamente, o osteossarcoma é classificado em subgrupos baseados em seu padrão celular e quantidade de matriz óssea, sendo subdividido como: osteoblástico, fibroblástico, condroblástico, subtipo vascular e o pobremente diferenciado, e embora diferentes no ponto de vista histológico, o comportamento biológico se dá de maneira semelhante nos cães (Straw et al., 1990). Segundo Morris & Dobson (2007), a região de metáfise de ossos longos apresenta maior prevalência para acometimento tumoral.

Os animais mais frequentemente acometidos são os de raça grande ou gigantes, incluindo Pastor Alemão, Boxer, São Bernardo e Golden Retriever (Tuohy, J. L. et al., 2019).

Os sinais clínicos mais frequentemente relatados incluem claudicação, dor e aumento de volume no membro acometido. O surgimento de fraturas espontâneas também pode ser observado (Straw, R. C. et al., 1996).

O diagnóstico do osteossarcoma é obtido pelo conjunto de sinais clínicos apresentados, exame físico, achados radiográficos, citologia e confirmado por biópsia incisional e análise histopatológica (Daleck et al., 2002; Dernell et al., 2007). Radiograficamente, o padrão encontrado é marcado por reação de osteólise, edema de tecido mole e formações ósseas irregulares no membro acometido, além de proliferação periosteal (Nelson & Couto, 2009). Também, a radiografia torácica é crucial durante todo acompanhamento do paciente para avaliar ocorrência de metástases pulmonares (Johnson & Watson, 2004). As Figuras 2, 3 e 4 são exemplos de imagens radiográficas características num quadro de osteossarcoma.

Figura 2 - Radiografia de membro torácico direito demonstrando proliferação óssea em região de ulna e edema de tecidos moles adjacentes. Projeção médio lateral.



Figura 3 - Radiografia de membro pélvico esquerdo demonstrando proliferação óssea em região de fêmur. Projeção látero-lateral.

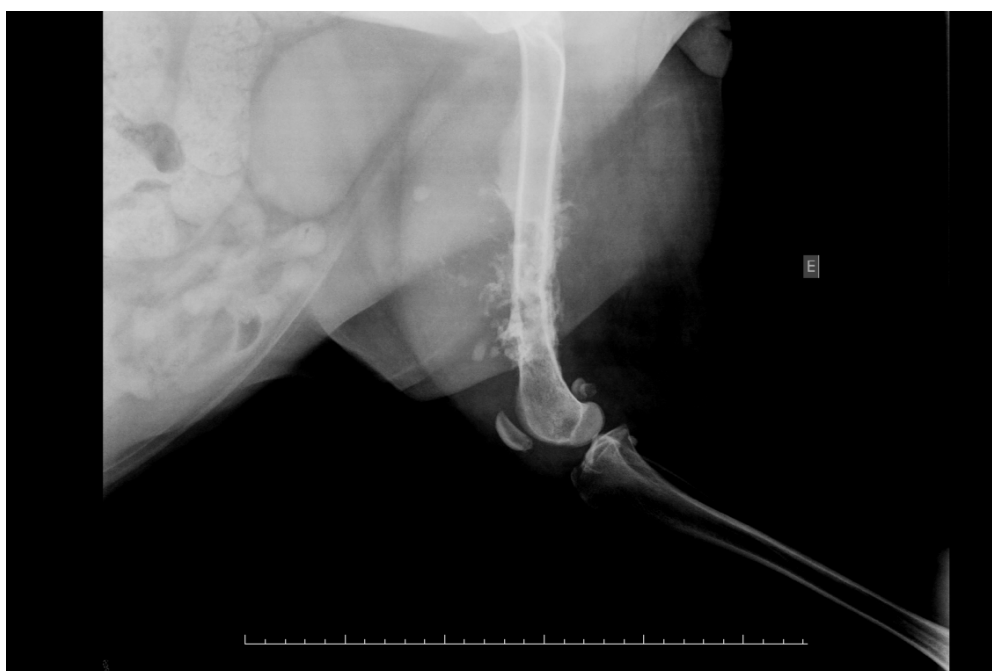
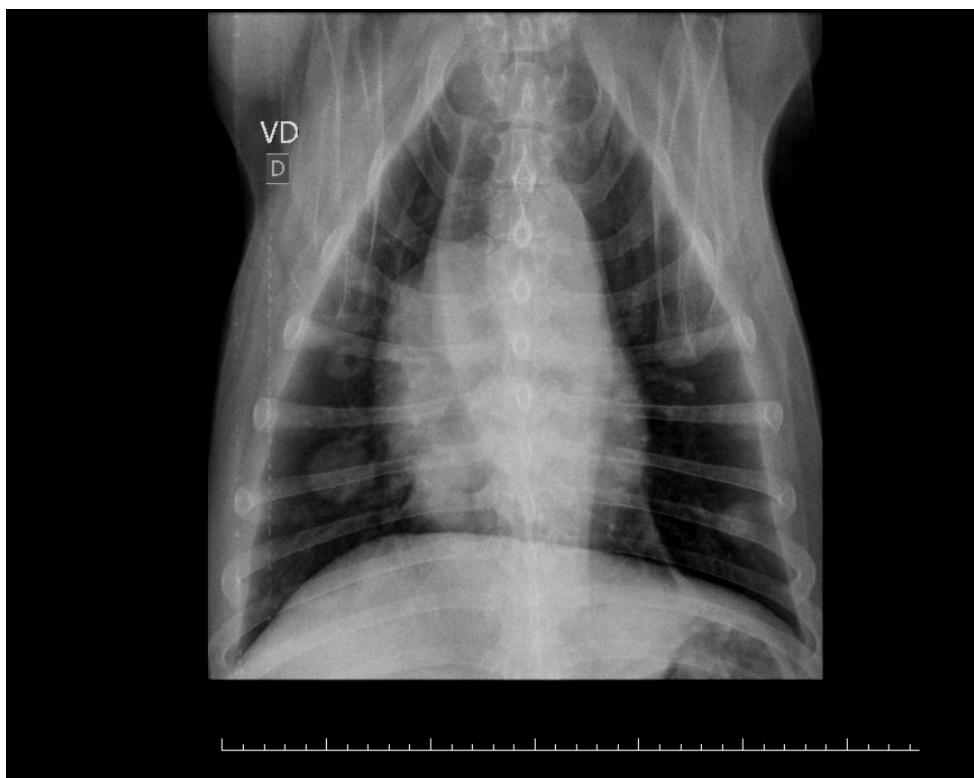


Figura 4 - Radiografia torácica demonstrando pulmão com presença de estruturas radiopacas compatíveis com metástases pulmonares.



O chamado sistema RANK/RANKL/OPG é o principal sistema envolvido na homeostase do tecido ósseo. Composto pelo receptor ativador do fator NF- κ B (RANK), seu ligante RANKL e osteoprotegerina. A expressão de RANKL se dá pelas células precursoras de osteoblastos, enquanto RANK advém das células precursoras de osteoclastos (Dougall, W. C. et al., 2014).

Em um organismo saudável, uma vez que o processo de reabsorção óssea tem seu início, os osteoblastos realizam produção de osteoprotegerina que se liga ao RANKL, evitando que este se ligue com seu receptor RANK, impedindo o início dos processos de produção e ativação de osteoclastos. Ao fim deste processo, os osteoclastos sofrem apoptose (Charles & Aliprantis, 2014). Em contrapartida, em um organismo acometido pelo OSA, este processo ocorre de forma desregulada, contribuindo para o crescimento tumoral (Ucci et al., 2021). No osteossarcoma, as células neoplásicas oriundas dos osteoblastos secretam RANKL de maneira excessiva, promovendo aumento e proliferação de osteoclastos. Por sua vez, este processo intensifica a reabsorção óssea, com aumento na secreção de citocinas pelas células estromais da medula óssea e maior liberação de fatores de crescimento tumoral (Von Moos & Haynes, 2013; Clarke, 2008).

No mecanismo tumoral, pesquisas pontuam o envolvimento das células tronco mesenquimais (MSCs) na progressão do tumor. Encontradas na medula óssea, as MSCs estão presentes no processo de regeneração tecidual em resposta à quimioterapia (Farmer, P. et al., 2009) e envolvidas na ocorrência de metástases por meio da liberação de citocinas (Weaver et al., 2002; Rhodes et al., 2010). Em estudo conduzido por Hillis, N. (2022), o nível de IL-8 foi considerado como biomarcador relevante para OSA canino, no qual o aumento de sua concentração se mostrou diretamente relacionado a um menor tempo de sobrevida em cães, além de ser relacionado ainda a aumento de tamanho e extensão local do tumor (Kushlinskii et al., 2014; Rutkowski et al., 2003). Outrossim, a avaliação dos níveis de IL-6 também se torna relevante, sendo bem conhecido seu papel na proliferação de células tumorais, formação de novos vasos e metástase (Tu et al., 2006).

Estudo realizado por Boerman, I. et al. (2012) apontou o aumento dos níveis de fosfatase alcalina sérica e tumores primários localizados em úmero como fatores negativos para osteossarcoma canino, comprometendo diretamente o tempo de sobrevida e intervalo livre de doença.

De modo geral, o prognóstico para OSA em cães é considerado ruim. Em literatura, a taxa de sobrevida após diagnóstico e tratamento é inferior a 45%. (Frimberger, A. E. et al., 2016; Moore, A. S. et al., 2007; Straw, R. C. et al., 1991)

3.2 Controle de dor e preservação do membro

A ocorrência de dor é um dos principais sinais clínicos apresentados pelos cães acometidos pelo OSA e constitui um dos principais fatores a afetar o comportamento e qualidade de vida do paciente.

A remoção do foco tumoral por meio da amputação do membro acometido é a forma mais rápida e efetiva de proporcionar alívio do foco doloroso (Frimberger, A. E. et al., 2016), entretanto, o manejo de dor se torna desafiador em pacientes com comorbidades que impeçam a ressecção cirúrgica, fazendo-se necessário a busca por outras alternativas que garantam qualidade de vida ao paciente.

Dores leves e esporádicas muitas vezes são bem toleradas, contudo, dores de nível moderado provocam mudanças comportamentais, como ausência de apetite e letargia, e dores intensas podem comprometer o estado fisiológico dos animais, podendo haver vocalização, sialorréia, aumento da frequência cardíaca e respiratória (Simon, 2006).

O controle da dor em pacientes oncológicos é indispensável na medicina humana e possui a mesma importância na medicina veterinária. A depender do grau de dor, diversos métodos podem ser aplicados buscando promover redução ou eliminação total do foco doloroso. Em humanos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) indica que o uso de fármacos com fins de analgesia seja feito de acordo com uma escala de dor. Na medicina veterinária isso não é diferente, embora a mensuração em animais se torne mais complexa devido a sua subjetividade.

Diante desta dificuldade, estudos foram feitos e atualmente podemos contar com diferentes escalas de mensuração, como a Escala de Dor Composta de Glasgow, que com base na análise de sinais comportamentais em diferentes etapas da avaliação permite mensurar dor aguda em cães, gerando ao final um sistema de pontuação que indica necessidade ou não de resgate analgésico, por exemplo (Mich & Hellyer, 2009; Morton, et al., 2005; Ferreira et al, 2014).

Na veterinária, a classe dos opióides e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) como carprofeno e meloxicam são os fármacos mais utilizados (Lascelles, 2005; Flôr, 2006).

3.3 Quimioterapia

Embora o tratamento cirúrgico seja importante para retirada do foco de dor (Frimberger, A. E. et al., 2016), cães que passaram pela ressecção cirúrgica como medida isolada não obtiveram aumento de sobrevida, apresentando média de apenas 76 dias (Szewczyk, M. et al., 2015). Em razão disso, diversos estudos visam avaliar os potenciais efeitos de quimioterapia adjuvante sobre a taxa de sobrevivência e intervalo livre de doença em cães acometidos com osteossarcoma.

Na oncologia veterinária, a carboplatina, doxorrubicina e cisplatina são os medicamentos mais utilizados (Szewczyk et al., 2015).

Dentre os quimioterápicos disponíveis, a carboplatina vem sendo amplamente utilizada para tratamento de osteossarcoma canino, possuindo fácil administração e sendo uma melhor opção em relação a cisplatina devido a menor nefrotoxicidade. Em cães, a mielossupressão é o efeito adverso mais relatado (Ehrhart et al., 2020; Page et al., 1993; Szewczyk et al., 2015).

A doxorrubicina apresenta efeito semelhante à carboplatina, também apresentando eficácia no controle de progressão da doença. A desvantagem no emprego de doxorrubicina se deve ao seu efeito cardiotóxico, o que torna a carboplatina como uma melhor opção (Selmic et al., 2014).

Além da monoterapia, o emprego de protocolos envolvendo uso de mais de uma substância também pode ser considerado como possível alternativa terapêutica. Em 2014, estudo realizado por Selmic et al. analisou os efeitos terapêuticos advindos da associação de doxorubicina e carboplatina pós cirurgia em 470 cães com OSA apendicular. Seus resultados demonstraram que não houve diferença significativa em intervalo livre de doença e tempo de sobrevida em comparação ao tratamento com as mesmas substâncias de forma isolada. Ademais, os protocolos de associação provocaram menores efeitos colaterais negativos nos animais participantes.

Atualmente, não há evidências que declarem a quimioterapia combinada como uma melhor opção de tratamento. Entretanto, em alguns casos, a redução dos efeitos pode caracterizar esses protocolos como uma melhor opção a longo prazo, proporcionando melhor qualidade de vida ao paciente (Szewczyk et al., 2015).

3.4 Imunoterapia

A transformação de células saudáveis em células malignas é um evento que pode ocorrer espontaneamente ou induzida por agentes virais, físicos ou químicos, e devido a semelhança dessas células com as demais dificultam a identificação e combate de células neoplásicas pelo sistema imune do hospedeiro (Stites, D. P, 1997) e devido a sua complexidade pode vir a, em algumas circunstâncias, contribuir para o crescimento tumoral (C. Chen et al, 2021).

O estudo da imunologia tumoral parte do fato de que essa diferenciação celular entre saudáveis e tumorais pode ser feita a partir dos antígenos expressos, que podem ser classificados como antígenos tumorais exclusivos, presentes apenas nas células tumorais, ou antígenos associados a tumores, os quais também podem ocorrer em células normais e podem ser identificados com auxílio de anticorpos monoclonais (Ghaffar, A. & Nagarkatti, M).

Para o combate de células com características de malignidade, o sistema imunológico faz uso de uma série de mecanismos. As chamadas células T atuam diretamente sobre elas por meio de células CD8⁺ e ativando células CD4⁺ que agem através de linfocinas. A classe de células B secretam anticorpos e as Natural Killer, mediadas pela liberação de fatores citotóxicos, atuam como primeira linha de defesa contra células que sofreram transformações. Além dessas, os macrófagos, ativados pelas citocinas INF- γ , a IL-4, o TNF e o GM-CSF, promovem lise tumoral (Ghaffar, A. & Nagarkatti, M). Em virtude de todas essas interações celulares, diversos estudos apontam a

imunoterapia como um forte potencial para tratamento do câncer, em especial o osteossarcoma, tendo em vista seu caráter imunogênico.

No Brasil, estudos realizados no Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia (Instituto de Biologia – UNICAMP) levaram ao desenvolvimento do composto sintético MRB-CFI-1, registrado comercialmente como Oncotherad®. Sendo um agonista dos TLR 2 e 4, este possui ação sobre as chamadas vias canônicas e não canônicas, que leva a expressão de genes interferon tipo I e II, promovendo liberação de citocinas pró inflamatórias e desencadeamento de efeitos antitumorais direta e indiretamente por meio da ativação e recrutamento de células dendríticas, NK, macrófagos e células T. Ainda, a ativação de IFN- γ resulta na inibição das Tregs (células reguladoras T imunossupressoras), as quais possuem relação direta com o mecanismo de escape imunológico de células neoplásicas (Ribeiro de Souza, B. et al., 2023).

3.5 Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos constituem uma classe de fármacos análogos sintéticos do pirofosfato, um regulador de reabsorção óssea naturalmente produzido pelo organismo (Fernandes, C. et al., 2005), sendo amplamente utilizados para tratamento de doenças como osteoporose, hipercalcemia maligna e na oncologia, em humanos e animais (Milner, R. J. et al., 2004).

Com grande afinidade com o tecido ósseo, os bisfosfonatos inibem o processo de reabsorção óssea, promovida pela ação dos osteoclastos, ao se ligar aos sítios de ligação dos cristais de hidroxiapatita. Ao iniciar a reabsorção do osso, os osteoclastos acabam por fagocitar as moléculas de bisfosfonatos ali presentes, este promove uma série de prejuízos à célula, que acaba perdendo a capacidade de formar borda em escova e de se aderir à superfícies.o óssea, impedindo que a reabsorção ocorra de forma contínua (Rodan, G. A. et al., 1996; Sato, M. et al., 1991; Colucci, S. et al., 1998) e levando a apoptose dos osteoclastos (Hughes, D. E. et al., 1995).

Assim, devido ao seu mecanismo de ação, embora a ressecção cirúrgica do membro acometido associado à quimioterapia antineoplásica seja a terapia de escolha para quadros de OSA apendicular em cães, o uso de BFs pode ser considerado como uma alternativa terapêutica importante para quadros inoperáveis, auxiliando no controle de dor e progressão da doença. (Jark PC. et al, 2013)

A administração dos bisfosfonatos é feita por via endovenosa (Milner, R. J. et al., 2004), e possui baixa meia vida plasmática, sendo rapidamente distribuído para a matriz óssea (Jark PC. et al., 2013). A porção que não é absorvida pelos ossos é excretada pelo rim (Fan TM. et al., 2005) .

Em casos de neoplasias ósseas primárias, como o osteossarcoma, a amputação de membro associada a quimioterapia continua sendo a terapia de escolha quando há acometimento do esqueleto apendicular (Ashton, JA. et al., 2005).

Em quadros de neoplasias ósseas, a dor é gerada em decorrência da presença das células tumorais no microambiente ósseo, resultando na liberação de mediadores químicos que estimulam nociceptores periosteais, gerando sensibilidade dolorosa. Além disso, outro fator doloroso se deve à reabsorção óssea osteoclástica que ocorre de forma desregulada gerando destruição do tecido ósseo. Assim, em virtude desses mecanismos, a conduta terapêutica analgésica ideal se dá com a combinação do processo de inibição da reabsorção óssea por parte dos osteoclastos e na erradicação das células cancerígenas (Fan ,TM. et al., 2009).

Na medicina veterinária, o Zoledronato, Pamidronato e Alendronato são os bisfosfonatos mais utilizados em cães. A ocorrência de distúrbios gastrointestinais e eletrolíticos e reações inflamatórias agudas constituem os efeitos colaterais mais frequentemente relatados (Jark PC. et al., 2013). O desencadeamento de quadros de diarreia ou vômito se deve ao fato de que os BFs sofrem baixa absorção no trato gastrintestinal, já quadros de edema, dor muscular e febre surgem principalmente quando a administração é feita por via endovenosa, devido a liberação de fatores de necrose tumoral e citocinas inflamatórias (Jark PC. et al., 2013; Fan TM. et al., 2005).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção de casos

Foram incluídos no estudo sete cães (5 fêmeas e 2 machos) portadores de osteossarcoma apendicular inoperável atendidos no Setor de Oncologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” - UNESP, Campus Jaboticabal. O diagnóstico de OSA foi obtido por meio de biópsia óssea, e excluídos animais com presença de metástase a distância. Os proprietários foram devidamente informados do conteúdo da pesquisa e concordaram em participar assinando termo de consentimento livre esclarecido. O protocolo de estudo animal foi aprovado pela CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais sob protocolo nº 003357 em 3 de junho de 2022.

Todos os cães foram submetidos a exames de sangue e análise bioquímica, sendo analisado: creatinina, fosfatase alcalina, albumina e proteínas totais, além de radiografia de tórax com três projeções a cada 30 dias, em virtude do OSA ter os pulmões como seu principal sítio de metástase.

O diâmetro do tumor foi mensurado por meio de paquímetro, considerando comprimento e largura. A resposta terapêutica foi determinada segundo os critérios do RECIST 1.1, considerando: resposta completa (RC, ausência completa de evidência tumoral), resposta parcial (RP, redução $\geq 50\%$ do volume tumoral e sem evidência de nova lesão tumoral), doença estável (DE, $< 50\%$ de alteração no volume tumoral e sem novas lesões tumorais) e progressão da doença (PD, aumento de $\geq 50\%$ no volume do tumor ou novas lesões tumorais) (Knapp et al., 2016).

A mensuração de intensidade de dor frente ao emprego de bisfosfonatos foi feita com base no Helsinki Chronic Pain Index (HCPI) juntamente aos tutores, avaliando fatores como claudicação, nível de atividade física e agressividade (Matsubara, L. M. et al., 2019).

4.2 Tratamento

De forma randomizada, os animais foram divididos em dois grupos: Grupo A (3 animais) recebeu tratamento experimental e Grupo B (4 animais) com tratamento controle convencional. O tratamento controle foi realizado com emprego de quimioterapia antineoplásica associada a analgésicos para controle da dor, já o tratamento experimental contou com quimioterapia antineoplásica associada a imunoterapia e bisfosfonatos.

Em ambos os grupos, a quimioterapia foi feita com carboplatina na dose de 250 a 300 mg/m², administrada IV durante 60 minutos a cada 21 dias, totalizando seis sessões. No grupo controle, a associação de analgésicos foi feita com uso de Tramadol, 4 mg/kg via oral (VO) a cada 12 horas, e Dipirona, 20-25 mg/kg VO a cada 12 horas, e Maxicam na dose de 0,2 mg/kg no primeiro dia e 0,1 mg/kg nos dias seguintes, VO uma vez ao dia, sendo a dose crônica feita com 0,05 mg/kg VO, com avaliação renal a cada 15-30 dias.

Para o tratamento experimental, a imunoterapia foi feita com Oncotherad (MRB-CFI-1), com protocolo dividido em etapas de indução e manutenção. A fase de indução se deu durante quatro semanas contínuas, com administração de 22 mg/m² via intramuscular duas vezes por semana, com intervalo de 72 horas entre as aplicações. Após esse período, a dose foi reajustada para 32,3 mg/m², sendo administrada a cada 15 dias até atingir um ano em tratamento ou até o final da vida do paciente. O emprego de bisfosfonatos foi feito com Ácido zoledrônico, na dose de 0,25 mg/kg diluído em 100 mL de cloreto de sódio, infundido em 15 minutos a cada 28 dias, ou Pamidronato, com dose de 1-2mg/kg, sendo aplicado a cada 28 dias.

4.3 Análise estatística

Para a análise estatística, foi empregado método de Kaplan Meier para a análise de sobrevida e tempo livre de metástase e a comparação das respostas obtidas pelos pacientes de ambos os grupos foi testada pelo Teste de Log Rank (Mantel Cox), ao nível de significância de 5%. Para análise dos dados, utilizou-se o programa estatístico de computação GraphPad Prisma.

5 RESULTADOS

5.1 Dados epidemiológicos

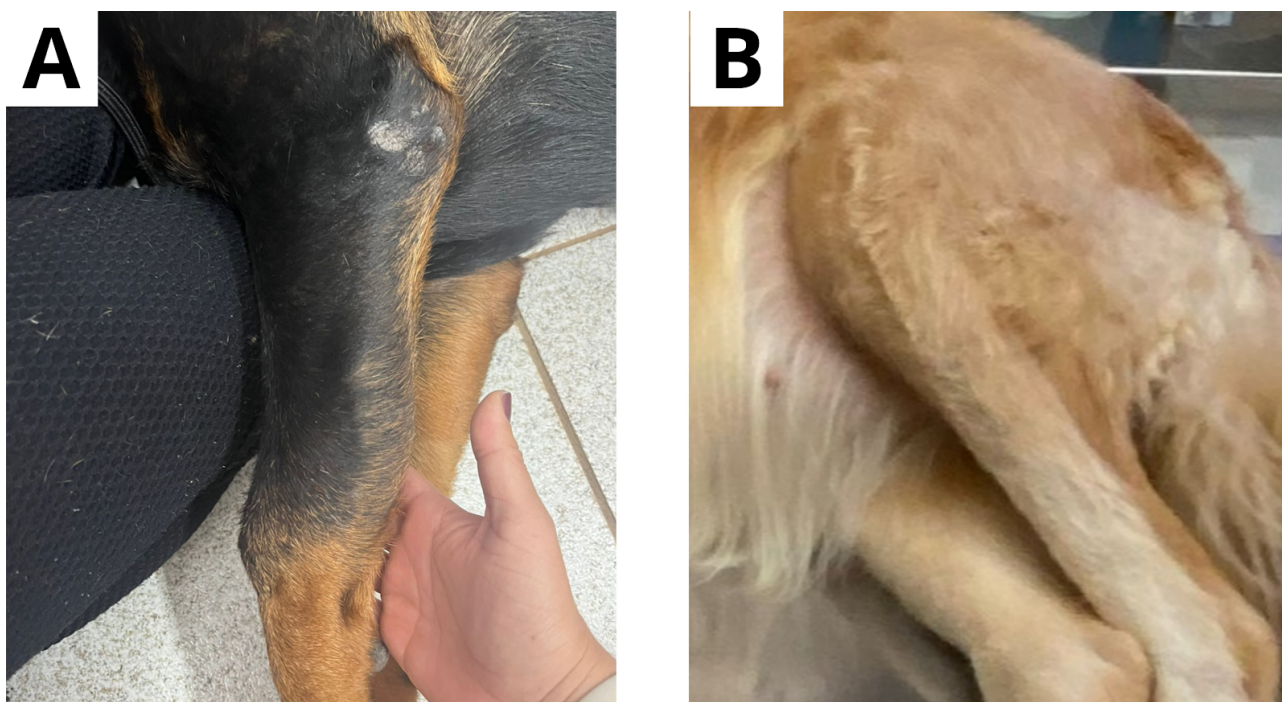
Os 7 cães incluídos na pesquisa apresentavam média de idade de 9,4 anos. Houve maior prevalência em cães da raça Rottweiler e 71,4% dos cães eram fêmeas.

Tabela 1 - Cães incluídos na pesquisa: raça, sexo e idade

Cães	Raça	Sexo	Idade
1	Rottweiler	Fêmea	10 anos
2	Rottweiler	Macho	5 anos
3	Golden Retriever	Fêmea	7 anos
4	Labrador Retriever	Fêmea	13 anos
5	American Pitbull	Fêmea	13 anos
6	Boxer	Macho	10 anos
7	SRD	Fêmea	8 anos

Os membros torácicos foram a localização mais frequente, correspondendo a 57% dos casos.

Figura 5 - Can. Rottweiler - Aumento de volume em membro torácico direito (A); Can. Golden Retriever - Aumento de volume em membro pélvico esquerdo (B).



5.2 Achados patológicos

Em biópsia pós morte, ao corte se apresentavam massas de característica encapsulada com coloração brancacenta a vermelho acastanhada e presença de focos de necrose.

Macroscopicamente, além daqueles previamente detectados, foi possível observar presença de focos de metástase em pulmão medindo menos de 10 milímetros, as quais não puderam ser detectadas no exame radiográfico para animais de ambos os grupos.

Figura 6 - Massa em membro torácico direito. (A, B) Ao corte, massa encapsulada de coloração acastanhada em região de rádio.

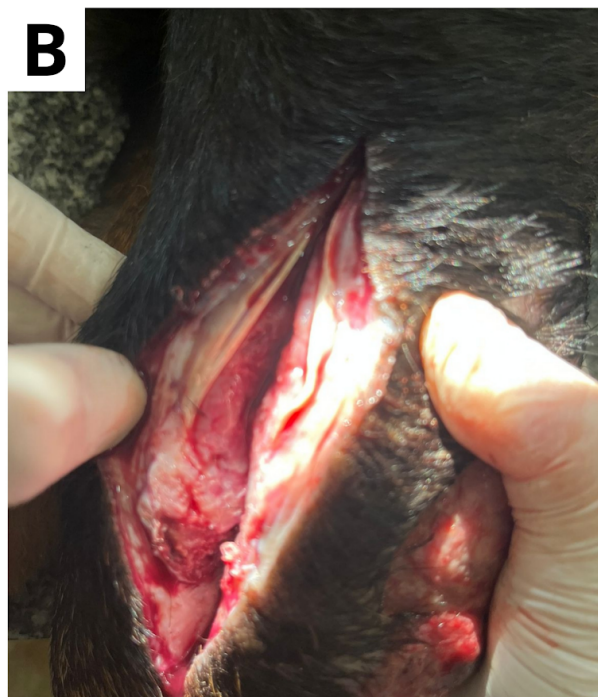
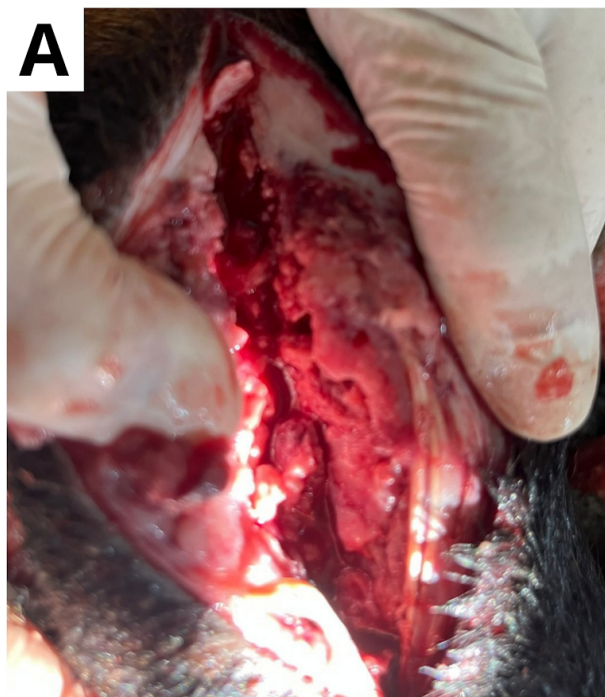
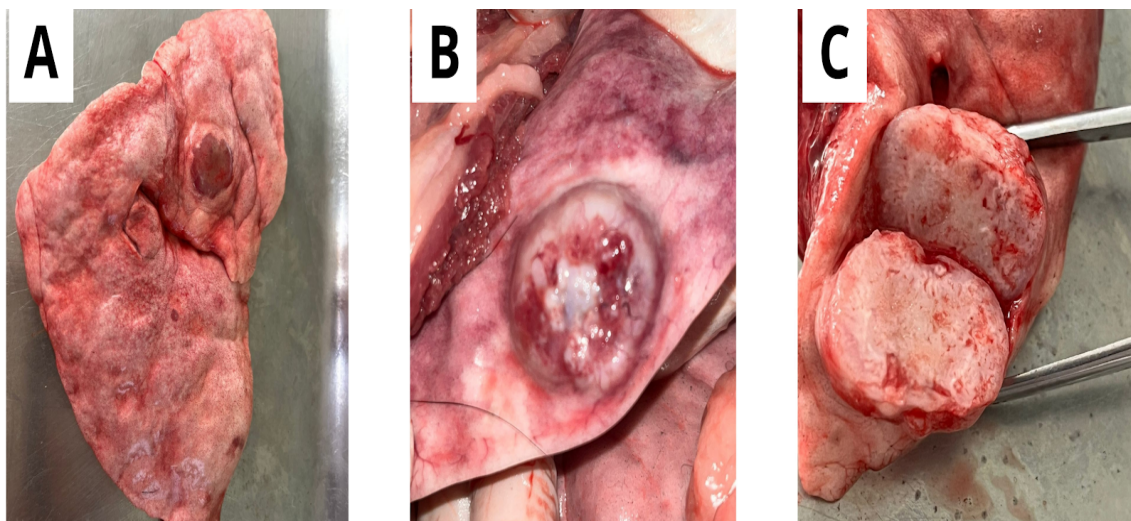


Figura 7 - Presença de nódulos em pulmão (A e B). Ao corte, nódulos calcificados (C).



5.3 Tempo de sobrevida e Tempo livre de metástase

No que se refere ao tempo de sobrevida, observamos que os pacientes do Grupo A apresentaram maior tempo de sobrevivência, atingindo uma média de 186 dias, quando comparados aos animais do Grupo B, com média de apenas 36 dias, demonstrado no Gráfico 1. Entretanto, embora a análise estatística não tenha demonstrado diferença significativa entre as variáveis ($p > 0,05$), foi possível observar que todos os cães que receberam o tratamento experimental conseguiram atingir no mínimo 120 dias em tratamento, em contraste aos resultados do Grupo B, onde 75% desses animais vieram a óbito com menos de 60 dias em tratamento.

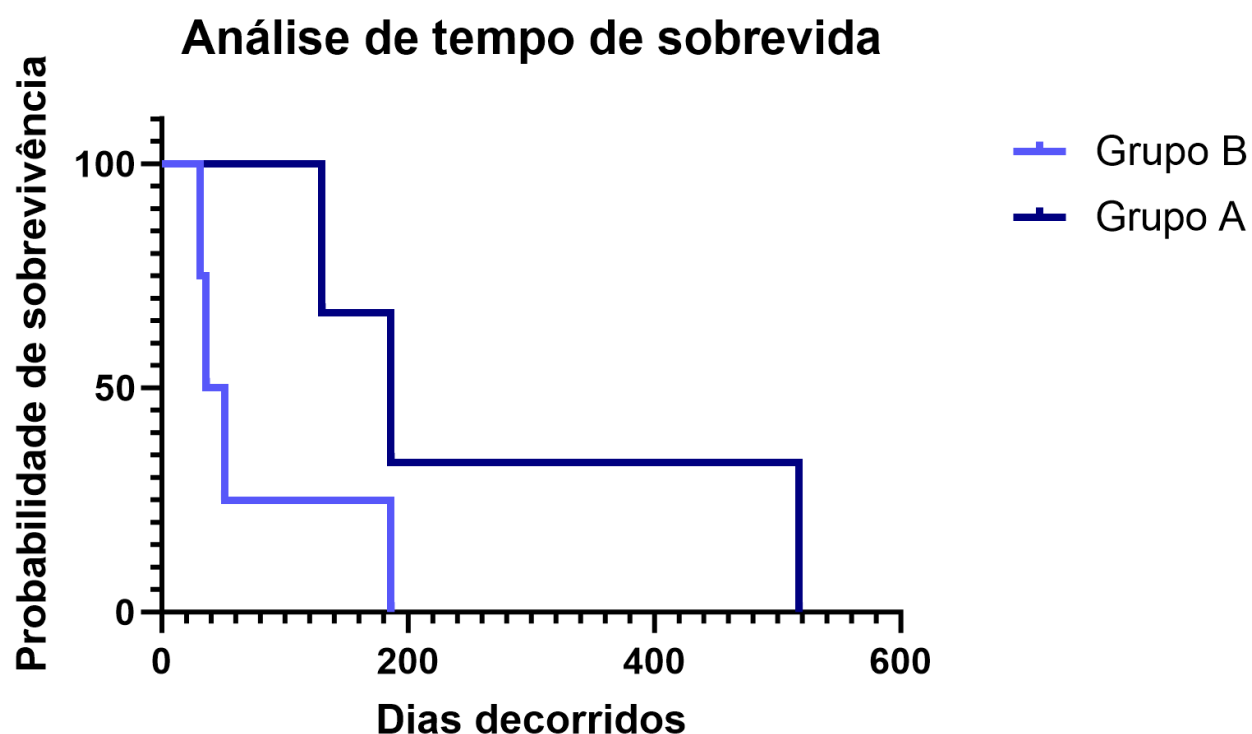


Gráfico 1 - Análise de sobrevida pelo Método Kaplan-Meier dos pacientes com OSA apendicular não amputados frente ao Tratamento Experimental (Grupo A).e Tratamento Controle (Grupo B).

Quanto ao tempo livre de metástase (TLM), também houve diferença entre os grupos. Os animais do Grupo A atingiram uma média de 242,3 dias TLM, enquanto os animais do Grupo B obtiveram média de 72 dias, apenas. O Gráfico 2 demonstra os resultados obtidos.

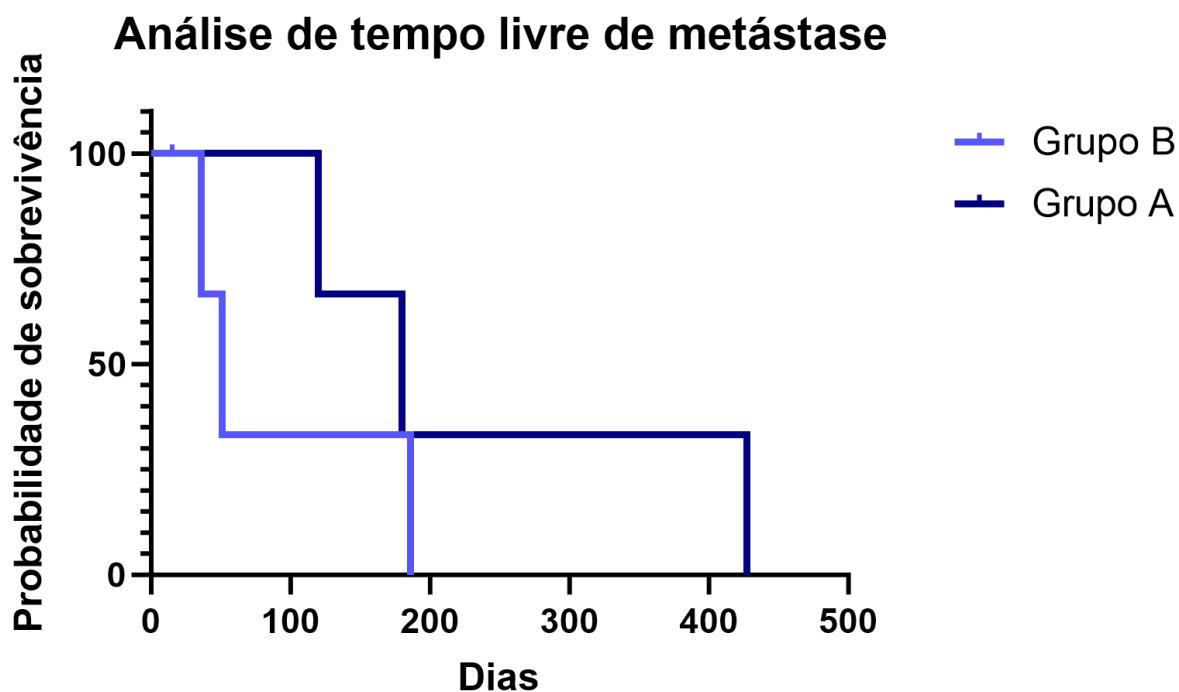


Gráfico 2 - Análise de tempo livre de metástase frente ao Tratamento Experimental (Grupo A) e Tratamento Controle (Grupo B).

Em análise feita com base no Helsinki Chronic Pain Index (HCPI), o emprego de Zoledronato e Pamidronato apresentou maior efetividade analgésica em relação ao uso de Tramadol, Dipirona e Maxicam no controle da dor óssea promovida pelo desenvolvimento tumoral. Com o uso de bisfosfonatos, o efeito colateral mais frequentemente observado foi a ocorrência de vômito nos primeiros dias após aplicação e, embora o Zoledronato seja uma droga considerada mais específica, não foi observada diferença significativa em relação ao Pamidronato neste estudo. Quanto à imunoterapia com Oncotherad, os animais tratados não apresentaram efeitos adversos significativos, como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Sinais adversos frente tratamento com Oncotherad®: Frequência e intensidade.

Efeitos adversos	Frequência relatada	Intensidade
Vômito	1	+
Prurido	1	+
Diarréia	1	+
Perda de peso	1	+
Alterações bioquímicas	1	+
Alterações em hemograma	1	+

Frequência: (1) nenhum ou apenas um animal apresentou; (2) dois a três animais.

Intensidade: (+) leve; (++) moderado; (+++) intenso.

Ainda, em análise realizada conforme os critérios do RECIST 1.1, 66,67% dos animais que receberam tratamento experimental (Grupo A) conseguiram atingir nível de doença estável (<50% de alteração no volume tumoral e sem novas lesões tumorais). O mesmo não pode ser observado em nenhum dos animais do Grupo B, com tratamento controle.

6 DISCUSSÃO

O osteossarcoma canino constitui uma neoplasia de demasiada complexidade onde fatores ligados a sua etiologia, comportamento tumoral e fatores prognósticos seguem em constante estudo em busca de que melhores alternativas terapêuticas sejam encontradas.

Na literatura, a localização do tumor está diretamente relacionada a sua malignidade e pior prognóstico, sendo os membros torácicos mais acometidos que os membros pélvicos (Culp et al., 2019). Os resultados obtidos neste estudo endossam esta afirmativa, no qual 57% dos animais apresentaram tumores localizados em membros torácicos.

Nos cães, algumas raças apresentam maior disposição para desenvolvimento de tumores ósseos. Em nosso estudo, mesmo com um baixo número de animais incluídos na pesquisa (n=7), cães da raça Rottweiler foram os mais frequentemente acometidos, como indicado por Tuohy, J. L. et al. (2019). Além da predisposição racial, embora pesquisas apontem que machos apresentam maiores chances de desenvolver a neoplasia (Withrow, T. et al., 1998), o presente estudo demonstrou maior ocorrência em fêmeas, representando 71,4% dos casos.

Devido a sua agressividade e alto potencial metastático, o OSA é foco de pesquisa na medicina humana e veterinária. Resultados presentes em artigo publicado por Luu AK (2021) sugerem que TGF β como um mediador que acaba por contribuir para a progressão tumoral. Além disso, no que se refere a análise dos linfócitos T, o número de células CD8⁺ era baixo em relação às Tregs na análise de sangue de cães com OSA quando comparados a animais saudáveis.

Estudo realizado por Withers et al. (2019), buscou determinar como as células do sistema imune se diferem em quadros de lesão primária e metastática. Este percebeu que os Linfócitos T e as Tregs (células T regulatórias) estão relacionadas em ambos os casos, e em estudo comparativo, observou que os infiltrados de células T e B, bem como os macrófagos apresentavam aumento significativo na lesão metastática em relação à primária (Withers, S. S. et al., 2019). Ademais, pesquisa realizada por (Allende, C. et al., 2020) demonstrou que cães com OSA apresentam maior nível sérico de citocinas, com níveis de IL-8 e IL12p40 aumentados quando comparados com pacientes saudáveis.

Em humanos e animais, pesquisas ainda se fazem necessárias para que os mecanismos de progressão tumoral do osteossarcoma sejam amplamente compreendidos. Segundo Colombe, P. et al. (2022), as células tumorais circulantes são responsáveis pelo desenvolvimento metastático, onde

perdem a capacidade de se aderir ao tumor sólido e adquirem capacidade de migrar pela corrente sanguínea. Wright T (2019) fez uso da citometria de fluxo para detecção de células tumorais circulantes em cães com osteossarcoma e pode observar que o nível de células tumorais circulantes se apresentavam reduzidos no sangue de cães amputados, níveis variáveis em cães recebendo quimioterapia e aumentado quatro semanas antes da detecção de metástase ou morte desses animais.

Em virtude da classificação do osteossarcoma como um tumor imunogênico, o emprego de imunoterapia pode ser considerado como uma nova alternativa terapêutica para um grupo reduzido de pacientes com osteossarcoma apendicular não operáveis. Recentemente, pesquisas demonstraram que o emprego de imunoterapia pode aumentar a resposta imune para combate das células tumorais, capaz de promover aumento de sobrevida, com a vantagem de persistência dos efeitos curativos (Sheng, W. Y. et al., 2011; Zhao, X. et al., 2021). Estudo realizado por Zhao, X (2021) demonstrou que o emprego de imunoterapia, com base na terapia de bloqueio de checkpoint imunológico, inibiu o crescimento de tumores a distância de forma efetiva em casos de OSA em camundongos, inibindo as atividades de Tregs e outras células imunossupressoras e ativando ainda mais linfócitos T citotóxicos. Também, pesquisa realizada por Flickinger, J. C. (2018) conseguiu demonstrar inibição de crescimento tumoral e indução de resposta imune anti tumoral secundária com o emprego de imunoterapia utilizando a *Listeria monocytogenes* como vetor. Ambas as pesquisas indicaram a não ocorrência de efeitos adversos significativos. Efeito semelhante foi alcançado com o uso de Oncotherad em nossa pesquisa, com apresentação de efeitos adversos mínimos, mostrou-se um fármaco efetivo e bem tolerado pelos animais em tratamento.

Em humanos, Meyers, P. A. (2011) comprovou a efetividade do emprego de pamidronato associado a quimioterapia em idosos com OSA e, em artigo publicado em 2018, LI, P. demonstrou a eficácia do Zoledronato na supressão de osteoclastos in vitro. In vivo, Ohba, T. (2014) concluiu que a osteólise induzida pelo OSA é diretamente relacionada ao crescimento tumoral, no qual a expressão de RANKL nas linhas celulares de osteossarcoma murino correlaciona-se com o seu potencial maligno, e o osteossarcoma agressivo estimula diretamente a diferenciação dos osteoclastos e a reabsorção óssea, e que os bisfosfonatos inibem a osteoclastogênese induzida por tumor através da diminuição da expressão de RANKL e aumento da produção de OPG. Também, Barger et al. (2007) concluiu que a ocorrência de dor está diretamente relacionada à expressão de RANK/RANKL em tumores ósseos. Assim como nos referidos artigos, devido ao seu mecanismo de ação mais específico, o uso de bisfosfonatos demonstrou maior eficácia analgésica quando comparados aos

fármacos utilizados no Grupo B (controle), segundo avaliação feita pela Helsinki Chronic Pain Index para escala de dor.

Em nossos resultados, o tratamento experimental se mostrou eficaz ao promover maior taxa de sobrevida e tempo livre de metástase, de modo que todos os pacientes tratados com Oncotherad, quimioterapia e bisfosfonatos conseguiram atingir no mínimo 120 dias em tratamento, o que não foi observado nos animais do grupo controle, onde 75% acabou vindo a óbito com menos de 60 dias em tratamento em virtude da progressão da doença. Em recente estudo realizado por Ringdahl-Mayland B (2022) na Universidade Estadual do Colorado (Colorado State University) testou o uso de bisfosfonatos associado a radioterapia paliativa em cães com osteossarcoma apendicular e demonstrou que não houve diferença significativa quanto ao emprego isolado de bisfosfonatos. Tais resultados, somados ao obtido em nossa pesquisa, demonstram não apenas a dificuldade no controle desta neoplasia, como a importância da inclusão da imunoterapia no protocolo terapêutico, frente a sua ação sobre os meios de progressão tumoral, podendo ser considerada como uma nova opção terapêutica viável no tratamento de cães que não podem ser amputados.

Em estudo recente, Reis et al. (2022) avaliou os efeitos do Oncotherad em modelo animal de câncer de bexiga induzido quimicamente e demonstrou que este atuou na diminuição dos níveis de RANK/RANK-L, com redução da imunorreatividade de PD-1/PD-L1, promovendo uma menor progressão tumoral. Além deste, o emprego de Oncotherad também demonstrou efeito positivo no tratamento de melanoma oral (Fonseca-Alves, C. E. et al., 2021) e carcinoma urotelial (Böckelmann, P. K. et al., 2019) em cães. No presente estudo, conforme classificação pelo RECIST 1.1, 66,67% dos animais tratados com imunoterapia (MRB-CFI-1), quimioterapia e bisfosfonatos conseguiram atingir maior tempo de doença estável, resultado que não foi observado no grupo controle.

Esses resultados indicam que, em virtude do caráter imunogênico do OSA, no qual há envolvimento não apenas das células do tecido ósseo mas células do sistema imune, como os linfócitos T e B na expressão de RANK/RANKL, podemos afirmar que o emprego da quimioterapia somado à imunoterapia com Oncotherad®, haja vista sua ação sob a via canônica e não canônica, inibindo expressão de fatores pró oncogênicos e estimulando via dos IFN para combate das células neoplásicas (Ribeiro de Souza, B. et al., 2023), uma vez associada ao emprego de bisfosfonatos, que atuam de forma direta impedindo reabsorção óssea pelos osteoclastos (Fernandes C et al., 2005),

uma nova opção de terapia antitumoral mais efetiva para cães com osteossarcoma apendicular não amputados, capaz de promover melhor controle de dor, maior tempo de doença estável, proporcionando maior qualidade de vida para estes animais.

CONCLUSÃO

A associação de imunoterapia com Oncotherad® (mrb-cf1-1), bisfosfonatos e quimioterapia nos cães com OSA apendicular não amputados pode ser considerada como uma nova estratégia multimodal para proporcionar menor progressão da doença, contribuindo no controle da dor e promovendo maior qualidade de vida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLENDE, C.; HIGGINS, B.; JOHNS, J. Comparação das concentrações séricas de citocinas entre cães saudáveis e pacientes com osteossarcoma canino no momento do diagnóstico. *Imunologia veterinária e imunopatologia*, v. 227, n. 110084, pág. 110084, 2020.

ALONSO, J. C. C. Efeitos da imunoterapia com oncotherad® (mrb-cfi-1) no tratamento de pacientes com câncer de bexiga não-músculo invasivo recidivado à terapia com bacillus calmette-guérin (bcg) e/ ou quimioterapia intravesica. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, 2020.

ASHTON, JA et al. Investigação dos efeitos do pamidronato dissódico na viabilidade in vitro de células de osteossarcoma de cães. *Am J Vet Res*, v. 885–891, 2005.

BARGER, AM et al. Expressão do ativador do receptor do ligante do fator nuclear kB (RANKL) em neoplasias de cães e gatos. *Revista de medicina interna veterinária*, v. 21, n. 1, pág. 133–140, 2007.

BERGMAN, PJ et al. Amputação e carboplatina para tratamento de cães com osteossarcoma: 48 casos (1991 a 1993). *Revista de medicina interna veterinária*, v. 2, pág. 76–81, 1996.

BÖCKELMANN, P. K. et al. New therapeutic perspective for bladder cancer in dogs: Toxicological and clinical effects of OncoTherad nanostructured immunotherapy. *Journal of physics. Conference series*, v. 1323, n. 1, p. 012022, 2019.

CANON, J. R. et al. Inhibition of RANKL blocks skeletal tumor progression and improves survival in a mouse model of breast cancer bone metastasis. *Clinical & experimental metastasis*, v. 25, n. 2, p. 119–129, 2008.

CHEN, C. et al. Immunotherapy for osteosarcoma: Fundamental mechanism, rationale, and recent breakthroughs. *Cancer letters*, v. 500, p. 1–10, 2021.

CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, v. 3 Suppl 3, n. Supplement_3, p. S131-9, 2008.

COLOMBE, P. et al. Blood biomarkers for canine cancer, from human to veterinary oncology. *Veterinary and comparative oncology*, v. 20, n. 4, p. 767–777, 2022.

COLUCCI, S. et al. Alendronate reduces adhesion of human osteoclast-like cells to bone and bone protein-coated surfaces. *Calcified tissue international*, v. 63, n. 3, p. 230–235, 1998.

CONRY, R. M.; RODRIGUEZ, M. G.; PRESSEY, J. G. Zoledronic acid in metastatic osteosarcoma: encouraging progression free survival in four consecutive patients. *Clinical sarcoma research*, v. 6, n. 1, p. 6, 2016.

CULP, W. T. N. et al. Canine osteosarcoma: where human and canine research intersect. *Annals of joint*, v. 5, p. 30–30, 2020.

DALECK C. R.; Fonseca C. S.; CANOLA J. C. Osteossarcoma canino - revisão. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, v. 5, n. 3, p. 233-242, 1 dez. 2002.

DALECK, C.R. Osteossarcoma canino. *Clínica Veterinária*, 1(15): 26-27, 1996.

DALECK, C. R.; NARDI, A. B. *Oncologia em Cães e Gatos* 2º ed. Rio de Janeiro:Roca, 2016.

DERNELL, W. S. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. St. Louis (USA: Elsevier, 2007.

DOUGALL, W. C.; HOLEN, I.; GONZÁLEZ SUÁREZ, E. Targeting RANKL in metastasis. *BoneKEy reports*, v. 3, p. 519, 2014.

DURÁN, N.; DIAS, Q. C.; FÁVARO, W. J. OncoTherad: A New Nanobiological Response Modifier, its Toxicological and Anticancer Activities. *Journal of Physics: Conference Series*, v. 1323, n. 012018, 2019.

EHRHART, N. P.; RYAN, S. D.; FAN, T. M. Tumors of the skeletal system. Em: *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 463–503.

FAN, T. M. et al. Double-blind placebo-controlled trial of adjuvant pamidronate with palliative radiotherapy and intravenous doxorubicin for canine appendicular osteosarcoma bone pain. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 23, n. 1, p. 152–160, 2009.

FARMER, P. et al. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nature medicine*, v. 15, n. 1, p. 68–74, 2009.

FÁVARO, W. J. et al. Role of OncoTherad immunotherapy in the regulation of toll-like receptors-mediated immune system and RANK/RANKL signaling: New therapeutic perspective for non-muscle invasive bladder cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, v. 37, n. 15_suppl, p. e16004–e16004, 2019.

FERNANDES, C.; LEITE, R. S.; LANÇAS, F. M. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. *Química nova*, v. 28, n. 2, p. 274–280, 2005.

FLICKINGER, J. C., Jr; RODECK, U.; SNOOK, A. E. *Listeria monocytogenes* as a vector for cancer immunotherapy: Current understanding and progress. *Vaccines*, v. 6, n. 3, p. 48, 2018.

FLOR, PB. Avaliação da eficácia e segurança do emprego do tramadol para analgesia em cães portadores de dor oncológica. PhD Thesis. Universidade de São Paulo, 2006.

FONSECA-ALVES, C. E. et al. Current status of canine melanoma diagnosis and therapy: Report from a colloquium on canine melanoma organized by ABROVET (Brazilian association of veterinary oncology). *Frontiers in veterinary science*, v. 8, 2021.

FRIMBERGER, A. E.; CHAN, C. M.; MOORE, A. S. Canine osteosarcoma treated by post-amputation sequential accelerated doxorubicin and carboplatin chemotherapy: 38 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 52, n. 3, p. 149–156, 2016.

GHAFFAR, A.; NAGARKATTI, M. *Imunologia*. Tradução: Phd Myres Hopkins. 14. ed. [s.l: s.n.].

GROSS, A. C. et al. IL-6 and CXCL8 mediate osteosarcoma-lung interactions critical to metastasis. *JCI insight*, v. 3, n. 16, 2018.

HILLIS, N. Circulating Serum Cytokine Concentrations as Biomarkers in Canine Osteosarcoma. Disponível em: <https://atrium.lib.uoguelph.ca/items/2b87d1cf-bcf8-42b9-9a28-0c60c17b04c4>

HUGHES, D. E. et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, v. 10, n. 10, p. 1478–1487, 1995.

JARK P. C. et al. Emprego dos bisfosfonatos em oncologia veterinária. *Veterinária e Zootecnia*, v. 20, n. 3, p. 404-415, set. 2013.

JOHNSON, K. A.; WATSON, A. D. J. *Tratado de Medicina Interna Veterinária - Doenças do Cão e do gato*. v. 2, p. 1988–2019, 2004.

KNAPP, D. W.; RUPLE-CZERNIAK, A.; RAMOS-VARA, J. A.; NAUGHTON, J. F.; FULKERSON, C. M.; HONKISZ, S. I. A nonselective cyclooxygenase inhibitor enhances the activity of vinblastine in a naturally-occurring canine model of invasive urothelial carcinoma. *Bladder Cancer*, v. 2, n. 2, p. 241-250, 2016.

KUSHLINSKII, N. E. et al. Components of the RANK/RANKL/OPG system, IL-6, IL-8, IL-16, MMP-2, and calcitonin in the Sera of patients with bone tumors. *Bulletin of experimental biology and medicine*, v. 157, n. 4, p. 520–523, 2014.

LAMORA, A. et al. TGF- β signaling in bone remodeling and osteosarcoma progression. *Journal of clinical medicine*, v. 5, n. 11, p. 96, 2016.

LASCELLES, B. D. X. et al. Improved survival associated with postoperative wound infection in dogs treated with limb-salvage surgery for osteosarcoma. *Annals of surgical oncology*, v. 12, n. 12, p. 1073–1083, 2005.

LI, P. et al. Minimally effective concentration of zoledronic acid to suppress osteoclasts in vitro. *Experimental and therapeutic medicine*, v. 15, n. 6, p. 5330–5336, 2018.

LIU, J. et al. Analgesia and curative effect of pamidronate disodium combined with chemotherapy on elderly patients with advanced metastatic bone cancer. *Oncology letters*, 2019.

LUU, A. K.; WOOD, G. A.; VILORIA-PETIT, A. M. Recent advances in the discovery of biomarkers for canine osteosarcoma. *Frontiers in veterinary science*, v. 8, 2021.

MEYERS, P. A. et al. Addition of pamidronate to chemotherapy for the treatment of osteosarcoma. *Cancer*, v. 117, n. 8, p. 1736–1744, 2011.

MICH, P. M.; HELLYER, W. *Métodos objetivos e categóricos para avaliar a dor e analgesia*. São Paulo, Roca, p. 78–112, 2009.

MILNER, R. J. et al. Bisphosphonates and Cancer. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 18, n. 5, p. 597, 2004.

MING, J.; CRONIN, S. J. F.; PENNINGER, J. M. Targeting the RANKL/RANK/OPG Axis for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*, v. 10, 7 ago. 2020.

MISDORP, W.; HART, A. A. Some prognostic and epidemiologic factors in canine osteosarcoma. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 62, n. 3, p. 537–545, 1979.

MORTON, C. M. et al. Application of a scaling model to establish and validate an interval level pain scale for assessment of acute pain in dogs. *American journal of veterinary research*, v. 66, n. 12, p. 2154–2166, 2005.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. *Small animal internal medicine - Elsevier eBook on vitalsource (retail access card)*. 4. ed. Londres, England: Mosby, 2009.

OHBA, T. et al. Bisphosphonates inhibit osteosarcoma-mediated osteolysis via attenuation of tumor expression of MCP-1 and RANKL. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, v. 29, n. 6, p. 1431–1445, 2014.

OGILVIE, G. K. BONE TUMORS. Em: *Veterinary Oncology Secrets*. [s.l.] Elsevier, 2001. p. 139–146.

ORY, B. et al. Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. *Cancer*, v. 104, n. 11, p. 2522–2529, 2005.

PAGE, R. L. et al. Pharmacokinetic and phase I evaluation of carboplatin in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 7, n. 4, p. 235–240, 1993.

PHILLIPS, B. et al. Use of single-agent carboplatin as adjuvant or neoadjuvant therapy in conjunction with amputation for appendicular osteosarcoma in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 45, n. 1, p. 33–38, 2009.

REIS, I. B. et al. OncoTherad® is an immunomodulator of biological response that downregulate RANK/RANKL signaling pathway and PD-1/PD-L1 immune checkpoint in non-muscle invasive bladder cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*, v. 149, n. 8, p. 5025–5036, 2023.

RHODES, L. V. et al. Adult human mesenchymal stem cells enhance breast tumorigenesis and promote hormone independence. *Breast cancer research and treatment*, v. 121, n. 2, p. 293–300, 2010.

RIBEIRO DE SOUZA, B. et al. A novel therapeutic strategy for non-muscle invasive bladder cancer: OncoTherad® immunotherapy associated with platelet-rich plasma. *International immunopharmacology*, v. 123, n. 110723, p. 110723, 2023.

RINGDAHL-MAYLAND, B.; THAMM, D. H.; MARTIN, T. W. Retrospective evaluation of outcome in dogs with appendicular osteosarcoma following hypofractionated palliative radiation therapy with or without bisphosphonates: 165 cases (2010–2019). *Frontiers in veterinary science*, v. 9, 2022.

RODAN, G. A.; FLEISCH, H. A. Bisphosphonates: mechanisms of action. *The journal of clinical investigation*, v. 97, n. 12, p. 2692–2696, 1996.

RUSSEL, RG. Bisphosphonates: mode of action and pharmacology. *Pediatrics*. 2007 Mar;119 Suppl 2:S150-62. doi: 10.1542/peds.2006-2023H. PMID: 17332236.

RUTKOWSKI, P. et al. Cytokine and cytokine receptor serum levels in adult bone sarcoma patients: Correlations with local tumor extent and prognosis. *Journal of surgical oncology*, v. 84, n. 3, p. 151–159, 2003.

SATO, M. et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *The journal of clinical investigation*, v. 88, n. 6, p. 2095–2105, 1991.

SELMIC, L. E. et al. Comparison of carboplatin and doxorubicin-based chemotherapy protocols in 470 dogs after amputation for treatment of appendicular osteosarcoma. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 28, n. 2, p. 554–563, 2014.

SHENG, W.-Y.; HUANG, L. Cancer immunotherapy and nanomedicine. *Pharmaceutical research*, v. 28, n. 2, p. 200–214, 2011.

SIMON D (2006). Palliative treatment in veterinary oncology. In *North American Veterinary Conference*.

SPODNICK, G. J. et al. Prognosis for dogs with appendicular osteosarcoma treated by amputation alone: 162 cases (1978-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 200, n. 7, p. 995–999, 1992.

STITES, D. P.; ETC. *Medical Immunology*. 9. ed. Stamford, CT, USA: Appleton & Lange, 1997.

STRAW, R. C. et al. Amputation and cisplatin for treatment of canine osteosarcoma. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 5, n. 4, p. 205–210, 1991.

STRAW, R. C.; WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. *Small animal clinical oncology*. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders. p. 287–315, 1996.

STRAW, R. C.; WITHROW, S. J.; POWERS, B. E. Management of canine appendicular osteosarcoma. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, v. 20, n. 4, p. 1141–1161, 1990.

SZEWCZYK, M.; LECHOWSKI, R.; ZABIELSKA, K. What do we know about canine osteosarcoma treatment? – review. *Veterinary research communications*, v. 39, n. 1, p. 61–67, 2015.

TU, B. et al. Mesenchymal stem cells promote osteosarcoma cell survival and drug resistance through activation of STAT3. *Oncotarget*, v. 7, n. 30, p. 48296–48308, 2016.

TUOHY, J. L. et al. Demographic characteristics, site and phylogenetic distribution of dogs with appendicular osteosarcoma: 744 dogs (2000-2015). *PloS one*, v. 14, n. 12, p. e0223243, 2019.

UCCI, A. et al. Anti-osteoblastogenic, pro-inflammatory and pro-angiogenic effect of extracellular vesicles isolated from the human osteosarcoma cell line MNNG/HOS. *Bone*, v. 153, n. 116130, p. 116130, 2021.

VON MOOS, R.; HAYNES, I. Where do bone-targeted agents RANK in breast cancer treatment? *Journal of clinical medicine*, v. 2, n. 3, p. 89–102, 2013.

WANG, J. et al. Checkpoint blockade in combination with doxorubicin augments tumor cell apoptosis in osteosarcoma. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, v. 42, n. 9, p. 321–330, 2019.

WEAVER, V. M. et al. Beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer cell*, v. 2, n. 3, p. 205–216, 2002.

WITHERS, S. S. et al. Metastatic immune infiltrates correlate with those of the primary tumour in canine osteosarcoma. *Veterinary and comparative oncology*, v. 17, n. 3, p. 242–252, 2019.

WITHROW, S. J. Osteosarcoma. *The Veterinary quarterly*, v. 20, n. sup1, p. S19–S21, 1998.

WRIGHT, T. et al. Flow cytometric detection of circulating osteosarcoma cells in dogs. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, v. 95, n. 9, p. 997–1007, 2019.

WYCISLO, K. L.; FAN, T. M. The immunotherapy of canine osteosarcoma: A historical and systematic review. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 29, n. 3, p. 759–769, 2015.

YAMAMURA, S. et al. Prostaglandin levels of primary bone tumor tissues correlate with peritumoral edema demonstrated by magnetic resonance imaging. *Cancer*, v. 79, n. 2, p. 255–261, 1997.

ZHANG, Y. et al. The RANK/RANKL/OPG system and tumor bone metastasis: Potential mechanisms and therapeutic strategies. *Frontiers in endocrinology*, v. 13, 2022.

ZHAO, X. et al. Combining photothermal ablation-based vaccine with immune checkpoint blockade for synergistic osteosarcoma immunotherapy. *Materials & design*, v. 198, n. 109311, p. 109311, 2021.